

PREPARACIÓN DE SOPORTES BIOMATERIALES DE NATURALEZA PROTEICA MEDIANTE ELECTROHILATURA

Marisa Erencia Millán¹, Jorge Macanás de Benito², Fernando Carrillo Navarrete^{1,2*}

¹INTEXTER, Universitat Politècnica de Catalunya, Colom 15, 08222-Terrassa

²ESEIAAT - Departamento de Ingeniería Química, Universitat Politècnica de Catalunya, Colom 1, 08222-Terrassa

** Autor para correspondencia: fernando.carrillo@upc.edu*

Resumen

La electrohilatura se ha postulado como un método sencillo, versátil y escalable a nivel industrial que permite obtener nanofibras por aplicación de un campo eléctrico de alto voltaje entre la punta de una aguja, donde se deposita una gota de solución de un polímero, y un colector metálico. Uno de los campos de aplicación más prometedor de esta tecnología es el enfocado al desarrollo de soportes biomateriales para el sector biomédico. Sin embargo, el control de los parámetros del proceso es clave para la obtención de productos eficaces. En este sentido, este trabajo presenta un estudio sistemático del efecto de los principales parámetros de la electrohilatura que pueden afectar al diámetro de las fibras obtenidas, enfocado específicamente al desarrollo de soportes biomateriales de naturaleza proteica (gelatina y colágeno), por tratarse de substratos de similar naturaleza a los componentes fibrosos encontrados en las matrices extracelulares de los tejidos biológicos. Los resultados obtenidos indican que factores como el tipo de polímero, la concentración, el disolvente y la conductividad del colector tienen una influencia significativa en el diámetro final de las nanofibras. Sin embargo, no se observó influencia en el diámetro cuando se varió el voltaje, caudal y distancia al colector del sistema.

Palabras clave: nanofibra, electrohilatura, gelatina, colágeno.

1. Introducción

La obtención de fibras de dimensiones nanométricas ha despertado un gran interés ya que está permitiendo el desarrollo de nuevos productos en ámbitos tales como biomedicina, catálisis, textil e ingeniería ambiental. No obstante, estos nuevos desarrollos requieren de técnicas flexibles y precisas que permitan controlar eficazmente el diámetro de las nanofibras que se pretenden obtener. Entre las diferentes tecnologías, la electrohilatura se ha postulado como un método sencillo, versátil y escalable a nivel industrial que permite obtener nanofibras. La electrohilatura es una técnica antigua que fue observada por primera vez en 1897 [1] y que Formhals patentó en 1934 [2] como un procedimiento para la obtención de fibras poliméricas de dimensiones nanométricas por aplicación de fuerzas electroestáticas. Sin embargo, no ha sido hasta estos últimos años cuando las investigaciones se han intensificado dando como resultado el desarrollo de productos con aplicación en diversos ámbitos tales como biomedicina, catálisis, textil, filtración e ingeniería ambiental [3].

El proceso de electrohilatura, comparado con otros métodos de obtención de nanofibras tales como “drawing” [4], moldeo [5], separación de fases [6] y autoensamblaje [7]), es un método versátil y simple que permite la hilatura de fibras por aplicación de un campo eléctrico de alto voltaje entre la punta de una aguja, a la que se alimenta una gota de la solución a hilar, y un colector metálico conectado a tierra (Figura 1). Cuando la fuerza electrostática que actúa sobre la gota de la solución de polímero supera su tensión superficial, la gota se deforma formándose el cono de Taylor [8,9] y la solución abandona la punta de la aguja en forma de un filamento continuo extremadamente fino que se recoge en un colector, que puede ser tanto rotativo como estacionario.

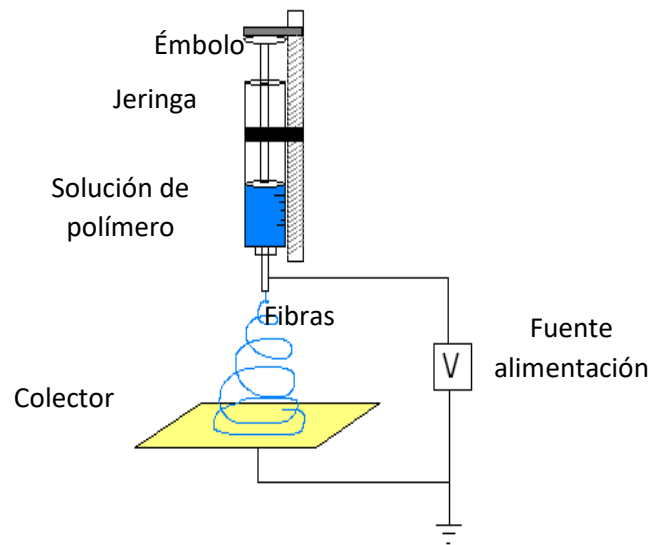


Figura 1. Esquema de una máquina de electrohilatura.

El control de las propiedades de las nanofibras obtenidas (diámetro, porosidad,..) pasa por un buen conocimiento de los parámetros que gobiernan el proceso de electrohilatura que fundamentalmente tienen relación con tres aspectos (Tabla1): las propiedades de la solución de hilatura (viscosidad, concentración, tensión superficial, peso molecular, conductividad), las condiciones del proceso (voltaje, distancia al colector, caudal) y las condiciones ambientales (humedad y temperatura).

Tabla 1. Efecto de los parámetros de electrohilatura en la morfología de las fibras.

	Efecto sobre las fibras	Estudios referenciados
Viscosidad	Baja: mala continuidad de las fibras. Alta: Aumento del diámetro.	Seda [10], Dextrano [11], PLGA [12,13], PEO [14-16], PVA [17-19], PLLA [20], PP [21]
Concentración	A mayor concentración, mayor diámetro de fibra.	Seda [10], Dextrano [11], PCL [22], PAN [23], PVA [18,24], PEO [15], PA-6 [25-27]
Tensión superficial	Baja: fibras sin gotas. Alta: Inestabilidad de chorro. Spraying.	PVA [17-19], PA-6 [25,26]
Peso molecular	A mayor peso molecular mejor continuidad de fibras.	PVA [18, 19, 28], PS [29], PA-6 [26, 20, 31]
Conductividad	Alta: menor diámetro. Fibras continuas. Baja: mayor diámetro.	PEO [14, 32], PVA [17], PP [21], PA-6 [33]
Voltaje	A mayor voltaje menor diámetro de fibra.	Seda [10], Dextran [11], PLGA [13], PEO [15,32, 34], PLLA [20], PA-6 [35], PAN [36]
Distancia al colector	Demasiado corta o demasiado larga produce fibras discontinuas.	Seda [10], Dextrano [11], PLGA [13], PVA [18], PA-6 [27], PAN [36]
Caudal	Menor caudal: fibras finas. Caudal demasiado alto: fibras discontinuas.	PEO [14], PVA [17], PCL [22], PA-6 [37]
Humedad	Alta humedad produce poros circulares en las fibras.	PLLA [20], PS [29]
Temperatura	Mayor temperatura da fibras de menor diámetro.	PA-6 [26, 33]

Numerosos polímeros han demostrado una buena capacidad para formar nanofibras en unas condiciones de electrohilatura específicas. Por ejemplo, se han obtenido nanofibras a partir de polímeros sintéticos (poliamida 6 [26], poliestireno [29], polipropileno [21], poliacrilonitrilo [36], polivinilalcohol [18], ácido poliláctico [38], policaprolactona [39], acetato de celulosa [40]), naturales (seda [10], chitosan [41], colágeno [42, 43] y gelatina [44, 45]), así como de mezclas de ambos tipos, incluyendo ácidos nucleicos [46], ácido hialurónico [47] y dextrano [48]. Si concentramos la atención en las posibilidades de obtención de soportes biomateriales para aplicaciones biomédicas que imiten las características de las matrices extracelulares de los tejidos biológicos, de especial relevancia son los métodos capaces de electrohilar polímeros de origen natural como el colágeno o la gelatina. Mientras los soportes fabricados a partir de polímeros sintéticos pueden imitar la morfología de las fibras que constituyen la matriz extracelular nativa, la capacidad de hilar polímeros naturales como el colágeno [42, 43] o la gelatina [49] proporciona adicionalmente a las células una plataforma más reconocible para su proliferación y diferenciación por tratarse de sustratos de similar naturaleza a los encontrados en las matrices extracelulares de los tejidos biológicos. No obstante, el uso de estos polímeros naturales está asociado a problemas de degradación y desnaturalización que pueden producirse durante las etapas de disolución de polímero y electrohilado.

Desde un punto de vista técnico, la elección del disolvente apropiado en función del tipo de polímero seleccionado es uno de los parámetros más importantes que influyen en el proceso de electrohilado, ya que éste determina la viscosidad, conductividad y tensión superficial de la disolución. En relación con la electrohilatura de colágeno y gelatina, los primeros disolventes utilizados capaces de disolver dichos polímeros fueron el

1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (HIPF) y el 2,2-trifluoroetanol (TFE) [44,49, 50-56], respectivamente. Sin embargo, su demostrada citotoxicidad combinada con su alto coste económico, ha hecho que se hayan buscado otras alternativas más prometedoras como el uso de ácidos carboxílicos, por ejemplo, el ácido acético o el fórmico para el caso de la gelatina (Tabla 2).

En base a las consideraciones anteriores, en el presente trabajo se estudia la viabilidad del proceso de obtención mediante electrohilatura de soportes biomateriales de gelatina y de colágeno para aplicaciones biomédicas. Además, el estudio presenta una cuantificación de la influencia de los parámetros operacionales en la morfología de las nanofibras obtenidas.

Tabla 2. Disolventes utilizados y condiciones de operación para la electrohilatura de gelatina.

Disolvente	[Gelatina]	[Disolvente]	T (°C)	Voltaje (kV)	Distancia (cm)	Caudal (ml/h)
2,2,2-Trifluoroetanol [44]	2,5 – 15 % w/v	Puro	Ambiente	10-16	12	0,8
Ácido Fórmico [57]	7-12 % w/v	98%	Ambiente	6-25	7,5 – 25	Ajustado
Acético glacial/ Etil acetato [58]	10%	AA 9-81% / EA 0-35%	37	12	8	0,06
Etanol +Ácido fórmico [59]	10-20 wt%	Etanol: 20 wt% Fórmico: 2 wt%	35	15-25	10	1
Acético/Fórmico [60]	5-29 wt%	Acido: 10-100%	40	-	15	-
Ácido acético [61]	6-12% w/v	Acético: 50-90%	Ambiente	10-16	8-15	-
Agua destilada [62]	30-40 wt%	Puro	40	22	12	-
Acético / Agua bidestilada [63]	30 w/v%	Acético: 60% Agua bidest: 40%	50	15	15	0,005
20xPBS/Etanol [64]	90-140 mg/ml	PBS: 5X-20X PBS/Etanol: 3:2/1:1/2:3	-	12	12	0,25

2. Materiales y métodos

2.1. Materiales

Se utilizaron gelatina en polvo procedente de piel de vaca (tipo B con un Bloom ~ 225g) y colágeno tipo I de piel de ternero, ambos suministrados por Sigma Aldrich, y utilizados sin tratamiento ni purificación. Como disolventes se utilizaron ácido acético glacial (99,99%, Panreac), 1,1,1, 3,3,3-hexafluoro 2-propanol (HIPF, Sigma Aldrich) y agua bidestilada. La conductividad del colector se varió utilizando láminas de aluminio o poliuretano que se colocaron sobre la superficie del colector.

2.2. Preparación de solución de hilatura

Los polímeros se disolvieron a temperatura ambiente ($25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$) en los correspondientes disolventes (ácido acético al 25% v/v y HIPF al 100%), manteniendo la agitación durante 1 hora siguiendo un procedimiento descrito previamente. La concentración de polímero (gelatina o colágeno) varió en función de su solubilidad en cada uno de los disolventes y del objetivo perseguido en el estudio. En este sentido, se plantearon los siguientes ensayos experimentales con el objetivo de evaluar los siguientes efectos:

- Efecto de los parámetros operacionales (voltaje, distancia al colector, caudal): se prepararon disoluciones de gelatina de 400 mg/ml utilizando ácido acético al 25 % v/v como disolvente. La solución fue electrohilada fijando las condiciones de operación que previamente se habían establecido según un diseño de experimentos en el que se varió el voltaje (10, 14 y 18 kV), la distancia al colector (7, 11 y 15 cm) y el caudal (0,25, 0,5 y 1 ml/h)

- Efecto de la concentración de polímero: se prepararon disoluciones de gelatina de diferente concentración (300 y 400 mg/ml) utilizando ácido acético al 25 % v/v como disolvente. La solución fue electrohilada fijando las condiciones de operación que previamente se habían establecido según un diseño de experimentos en el que se varió el voltaje (10, 14 y 18 kV), la distancia al colector (7, 11 y 15 cm) y el caudal (0,25, 0,5 y 1 ml/h)
- Efecto del tipo de disolvente: El polímero de gelatina se disolvió en HIPF (80 mg/ml) y ácido acético al 25% v/v (300 mg/ml). Dado el diferente comportamiento del polímero en cada uno de los disolventes, no fue posible preparar una solución con la misma concentración de gelatina. La concentración máxima electrohilable en HIPF es de 100 mg/ml, mientras que la concentración mínima electrohilable en ácido acético es de 200 mg/ml por lo que se seleccionaron concentraciones electrohilables de 80 y 300 mg/ml, respectivamente.
- Efecto del tipo de polímero: Gelatina y colágeno fueron disueltos en HIPF a la concentración de 80 mg/ml.
- Efecto de la conductividad del colector: Una disolución de gelatina en HIPF (80 mg/ml) fue electrohilada variando la conductividad del colector mediante el recubrimiento del mismo con una lámina de aluminio o poliuretano.

2.3. Electrohilatura

La electrohilatura se llevó a cabo a temperatura ambiente ($25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$) en una máquina construida en INTEXTER. La solución de hilatura se dispuso en una jeringa de 2,5 mL con una aguja de acero inoxidable de 0,6 mm de diámetro interno, conectada al ánodo de la fuente de alimentación. Las fibras de polímero electrohiladas se recogieron en un colector colector de

cobre conectado al cátodo de la fuente de alimentación. La conductividad del colector se varió recubriendo el colector con láminas de otros materiales (celulosa o poliuretano)

2.4. Caracterización de la morfología de las nanofibras

La morfología de las fibras electrohiladas se analizó utilizando un microscopio electrónico de barrido (Phenom Standard SEM, Phenom-World, Netherlands). Las muestras se analizaron sin ningún recubrimiento metálico.

El diámetro medio de las fibras se contabilizó por medio de la medida del diámetro de 50 fibras escogidas azar utilizando un programa de análisis de imagen (ImageJ).

2.5. Análisis estadístico

Los resultados fueron analizados utilizando el programa MODDE 8.0.2 (Umetrics AB) con objetivo de evaluar la significación de la influencia de los parámetros estudiados en el diámetro final de las fibras obtenidas.

3. Resultados y discusión

3.1. Efecto de los parámetros operacionales

La Tabla 3 muestra las condiciones en que fue posible obtener nanofibras de gelatina y, en su caso, el diámetro medio de las nanofibras obtenidas. Como puede observarse en los casos en los que se obtienen nanofibras, éstas muestran un diámetro alrededor de los 350 nm. Además, los parámetros operacionales no parecen tener una influencia significativa en el diámetro de las

fibras que en todos los casos en que pudieron obtenerse nanofibras éste estuvo comprendido entre 310-380 nm. Sin embargo, sí que se observó una relación entre los parámetros operacionales y la viabilidad de la técnica, ya que, en algunos casos, no fue posible la obtención de nanofibras (experimentos 4, 7, 10 y 19) y, en otros, el chorro de hilatura presentó inestabilidad dificultando la obtención de las mismas (experimentos 8, 13, 16, 17 y 22). Por lo tanto, puede concluirse que el voltaje, caudal y distancia al colector afectan fundamentalmente a la viabilidad de la electrohilatura (el sistema hila o no hila) pero sin que éstos tengan un efecto significativo sobre el diámetro de las nanofibras obtenidas dentro de los intervalos de condiciones que fueron estudiados. En este sentido puede observarse como para cualquier caudal, la electrohilatura es viable siempre que el voltaje sea suficientemente elevado para conseguir el estirado del polímero y la distancia al colector la adecuada para que el campo eléctrico aplicado pueda actuar. Además, las condiciones en las que la electrohilatura no es viable corresponden a las de voltaje bajo y distancias al colector elevadas.

Tabla 3. Diámetro medio de las nanofibras y viabilidad de la electrohilatura (formación de nanofibras/Inestabilidad del chorro/Sin formación de fibras) para disoluciones de gelatina en ácido acético al 25% v/v (400 mg/ml)

Experimento	Voltaje (kV)	Distancia (cm)	Caudal (ml/h)	Diámetro medio (nm)	Viabilidad de electrohilatura
1	10	7	0.25	370 ± 38	Nanofibras
2	14	7	0.25	344 ± 35	Nanofibras
3	18	7	0.25	361 ± 44	Nanofibras
4	10	11	0.25	-	Sin fibras
5	14	11	0.25	352 ± 39	Nanofibras
6	18	11	0.25	347 ± 41	Nanofibras
7	10	15	0.25	-	Sin fibras
8	14	15	0.25	350 ± 45	Inestable
9	18	15	0.25	340 ± 48	Nanofibras
10	10	7	0.5	-	Sin fibras
11	14	7	0.5	351 ± 37	Nanofibras
12	18	7	0.5	364 ± 38	Nanofibras
13	10	11	0.5	346 ± 47	Inestable
14	14	11	0.5	357 ± 30	Nanofibras
15	18	11	0.5	348 ± 26	Nanofibras
16	10	15	0.5	348 ± 29	Inestable
17	14	15	0.5	380 ± 59	Inestable
18	18	15	0.5	332 ± 47	Nanofibras
19	10	7	1	-	No fibras
20	14	7	1	365 ± 39	Nanofibras
21	18	7	1	354 ± 49	Nanofibras
22	10	11	1	-	Inestable
23	14	11	1	348 ± 39	Nanofibras
24	18	11	1	366 ± 29	Nanofibras
25	10	15	1	319 ± 39	Inestable
26	14	15	1	323 ± 37	Nanofibras
27	18	15	1	311 ± 24	Nanofibras

3.2. Efecto de la concentración de polímero

A parte de los parámetros operacionales, se ha demostrado que el efecto de la concentración del polímero en el diámetro de las nanofibras es otro parámetro importante ya que afecta directamente a la viscosidad de la solución de hilatura, habiéndose observado un incremento del diámetro, de $\sim 200 \text{ nm} \pm 25$ hasta $\sim 350 \text{ nm} \pm 40$, al aumentar la concentración de la solución de gelatina de 300 a 400 mg/ml, respectivamente (Figura 2). Estos resultados confirman los resultados de estudios precedentes, en los que se observó un aumento del diámetro, a medida que se incrementó la concentración del polímero en la solución de hilatura, debido a un aumento de la viscosidad del sistema (Tabla 1).

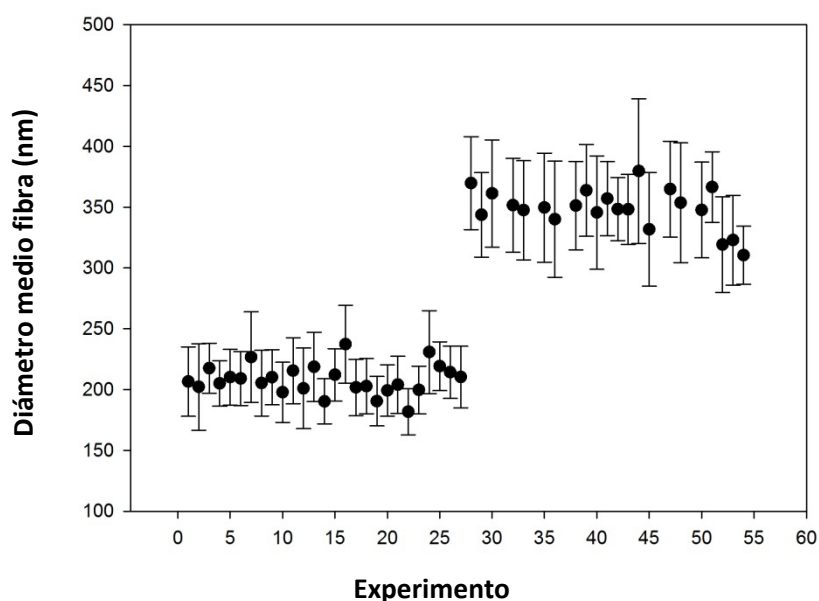


Figura 2. Diámetro medio de las nanofibras de gelatina obtenidas para diferentes condiciones de operación (voltaje, distancia al colector y caudal) para soluciones de diferente concentración (300 mg/ml (abajo) y 400 mg/ml (arriba))

La influencia de los parámetros operacionales (voltaje, distancia al colector y caudal) y de la concentración de la solución de hilatura en el diámetro de las fibras fue analizada estadísticamente. Los resultados mostraron, con un 95% de probabilidad, que el único parámetro que afectó significativamente al diámetro de las nanofibras fue la concentración de la solución, sin que se observara ningún tipo de efecto ni de los parámetros operacionales ni de ninguna de las interacciones que pudiera haber entre los mismos (Figura 3).

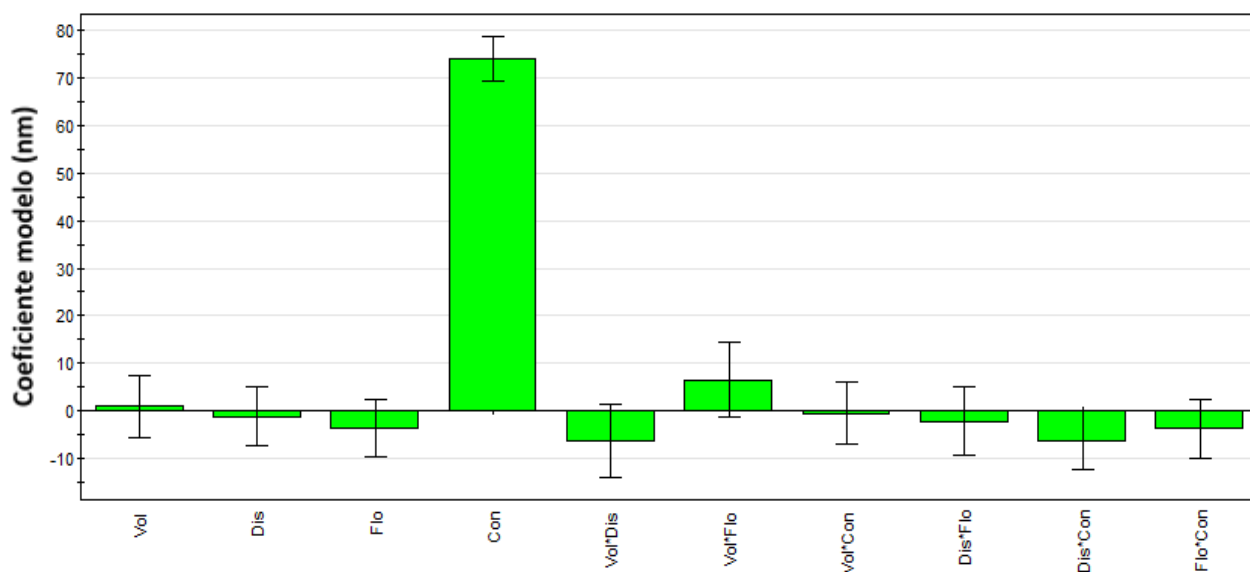


Figura 3. Coeficientes del modelo lineal mostrando el efecto de los parámetros investigados en el diámetro de las nanofibras (Con: concentración, Vol: voltaje, Dis: distancia al colector, Flo: Caudal).

3.3. Efecto del tipo de disolvente

Los resultados mostrados en la Figura 4 indican que se obtuvieron nanofibras de mayor diámetro para las soluciones preparadas con HIPF, sin que nuevamente se observaran diferencias entre los ensayos realizados variando los parámetros operacionales (voltaje, distancia al colector, caudal - experimentos 1 al 18).

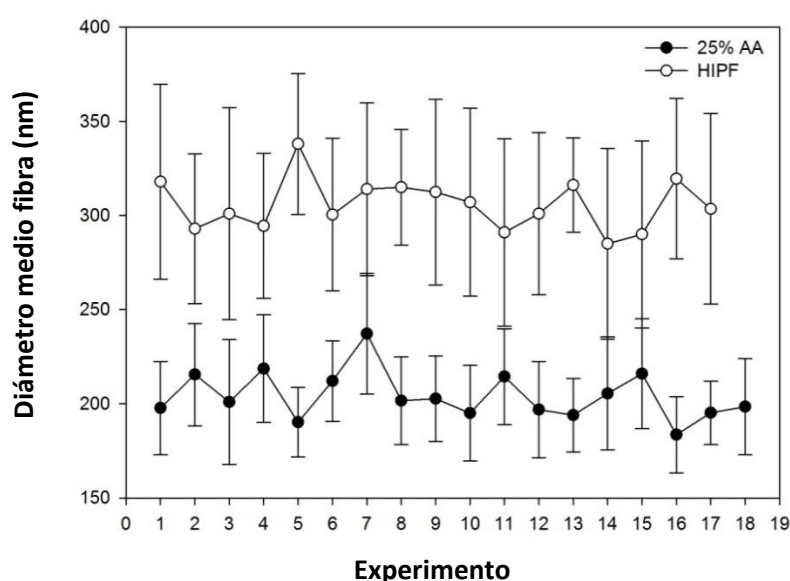


Figura 4. Diámetro medio de las nanofibras de gelatina obtenidas para diferentes condiciones de operación (voltaje, distancia al colector y caudal) y para soluciones preparadas con dos disolventes diferentes (80 mg/ml en HIPF y 300 mg/ml en ácido acético (AA) al 25 % v/v)

Teniendo en cuenta que la viscosidad de la solución preparada con ácido acético es mayor que la de HIPF, 338 cP frente a 40 cP, respectivamente, cabría esperar un comportamiento contrario al obtenido, según lo expresado en el apartado 3.2. Sin embargo, en este caso las propiedades del disolvente juegan un papel relevante condicionando el diámetro de las fibras. En este

sentido, como se muestra en la Tabla 4, la constante dieléctrica del HIPF es unas 4,5 veces inferior a la de una disolución de ácido acético al 25 % v/v, mientras que la tensión superficial es unas 2,5 veces inferior, es decir, el HIPF presenta una menor conductividad eléctrica y tensión superficial. Teniendo en cuenta que no ha sido demostrado de una forma clara que haya una relación entre la tensión superficial y el tamaño de las nanofibras [65], es probable que el comportamiento observado sea debido fundamentalmente a la diferencia de conductividad existente entre ambos disolventes. Consecuentemente, el diámetro de las fibras disminuye cuando la electrohilatura se efectúa con la solución de gelatina en ácido acético que es la que presenta una mayor conductividad eléctrica.

Tabla 4. Propiedades de los diferentes disolventes utilizados para preparar las soluciones de hilatura

Disolvente	Tensión Superficial (mN/m)	Constante Dieléctrica	Punto de ebullición (°C)	Densidad (g/ml)
HIPF	16.1	16.7	58.2	1.596
Agua	72.8	80	100	1.000
Ác. Acético	26.9	6.2	118.1	1.049
25% Acético	~40 [66, 67]	~ 77 [67]	-	~1.060[67]

3.4. Efecto del tipo de polímero

Gelatina y colágeno son dos de los polímeros naturales más utilizados en el campo de la ingeniería biomédica debido a sus buenas propiedades de biocompatibilidad y biodegradabilidad. Además, la gelatina compite con el colágeno debido a su bajo coste económico. El disolvente más utilizado para la electrohilatura de estos polímeros es el HIPF a concentraciones alrededor de 80 mg/ml [42, 49, 68]. Sin embargo, el comportamiento de cada

polímero frente a la electrohilatura es de esperar que sea diferente debido a sus diferencias estructurales. Cuando disoluciones de gelatina y colágeno en HIPF (80 mg/ml) se electrohilaron en diferentes condiciones de operación se obtuvieron los resultados que se muestran en la figura 5.

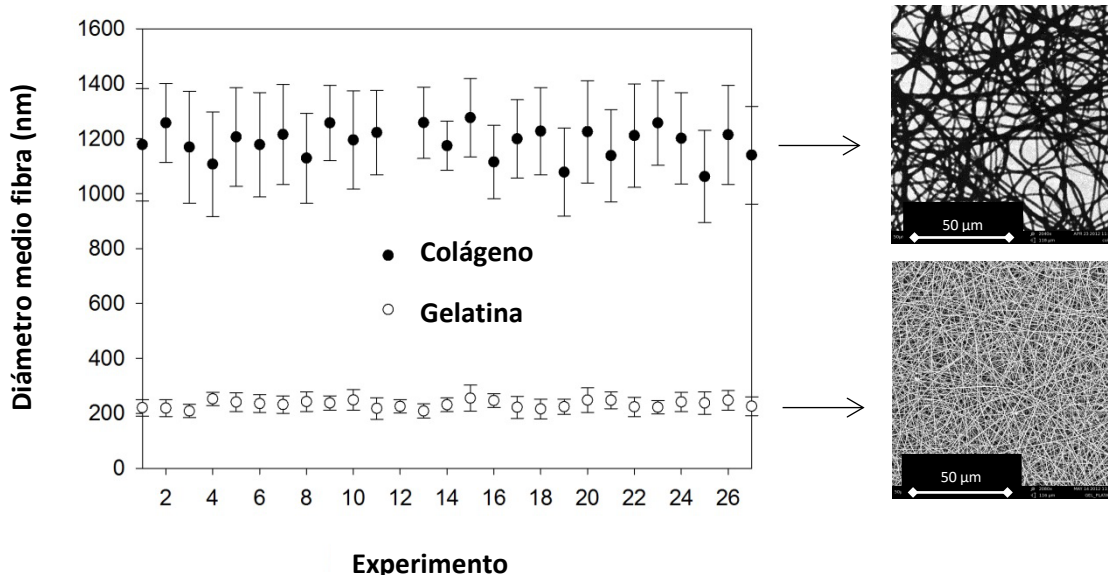


Figura 5. Diámetro medio de las nanofibras de gelatina y colágeno obtenidas para diferentes condiciones de operación (voltaje, distancia al colector y caudal) y para soluciones de 80 mg/ml en HIPF.

Como puede observarse las diferencias en el diámetro de las fibras obtenidas son significativas. Mientras el colágeno muestra diámetros de $1200 \text{ nm} \pm 160 \text{ nm}$, las nanofibras de gelatina son significativamente más finas con diámetros de $200 \text{ nm} \pm 30 \text{ nm}$. Teniendo en cuenta que ambos polímeros tienen una naturaleza química similar, estas diferencias están directamente relacionadas con el peso molecular del polímero que determina las propiedades reológicas de la solución tal como la viscosidad [69]. En este caso, el peso molecular del colágeno (300kDa) es 6 veces el peso molecular de la gelatina (50 kDa), por lo que para la misma concentración el diámetro de las nanofibras será superior para el colágeno que para la gelatina.

3.5. Efecto de la conductividad del colector

La deposición de fibras electrohiladas sobre colectores de diferente conductividad es un factor interesante de estudio para determinadas aplicaciones tal como el recubrimiento de biomateriales no conductores (por ejemplo, poliuretano) como los utilizados frecuentemente en ingeniería de tejidos [70]. En base a esta hipótesis, se determinó el diámetro de las nanofibras electrohiladas sobre el colector del sistema que se recubrió, en el primer caso, con una lámina conductora de aluminio de 0,020 mm (conductividad = 3.6×10^7 S/m), y en el segundo caso, con una lámina no conductora de poliuretano de 0,135 mm de espesor (conductividad = 1.6×10^{-3} S/m). En ambos casos, la solución de hilatura utilizada se preparó disolviendo gelatina en HIPF a una concentración de 80 mg/ml. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 6.

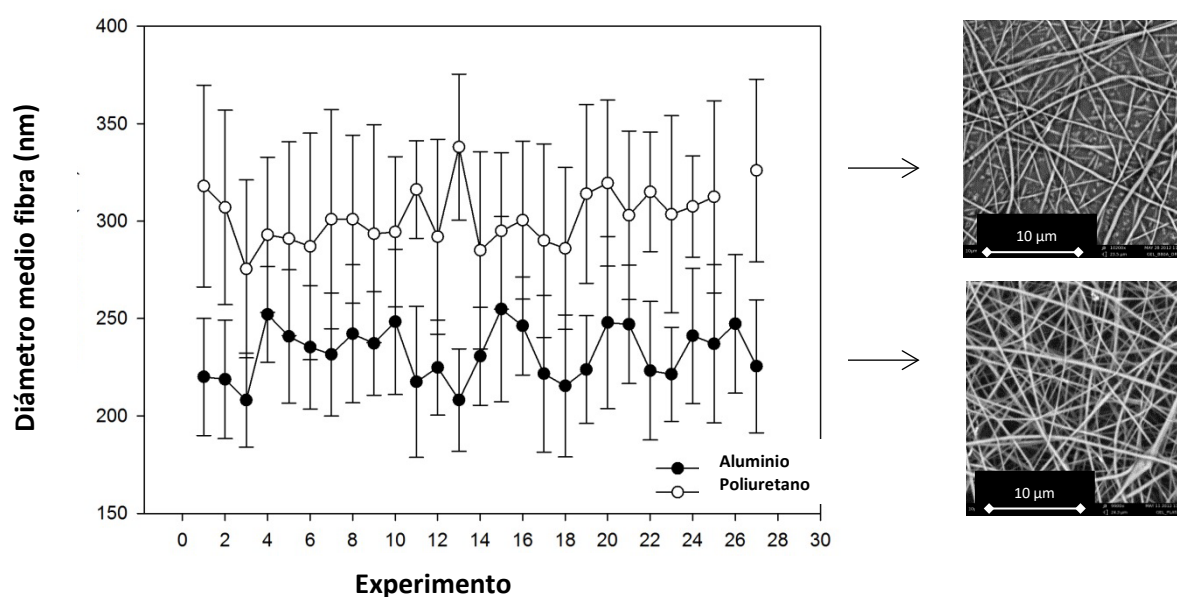


Figura 6. Diámetro medio de las nanofibras de gelatina recogidas sobre un colector de aluminio (conductor) y otro de poliuretano (no conductor) para diferentes condiciones de operación (voltaje, distancia al colector y caudal) y para soluciones de 80 mg/ml en HIPF

En este caso, el diámetro de las nanofibras depositadas sobre el colector conductor fue inferior (200-250 nm) al de las fibras electrohiladas sobre la lámina de poliuretano (~ 300 nm). Es conocido que la conductividad del colector está íntimamente relacionada con las fuerzas electrostáticas que actúan en la deposición de las fibras cargadas y que inciden sobre la densidad de empaquetamiento de las mismas [71]. De esta forma, las nanofibras recogidas sobre un colector no conductor presentan una densidad de empaquetamiento inferior a las recogidas sobre un colector conductor debido a la repulsión entre cargas que se promueve en el primer caso, impidiendo que más fibras sean atraídas hacia el colector. Contrariamente, en un colector conductor, las cargas de las fibras son fácilmente disipadas permitiendo que más fibras sean atraídas hacia el colector [68, 72]. Las microfotografías mostradas en la Figura 6 confirman las afirmaciones anteriores, donde puede apreciarse una mayor densidad de fibras en las muestras electrohiladas sobre el colector de aluminio.

4. Conclusiones

Los resultados obtenidos han demostrado que es posible obtener nanofibras de gelatina y de colágeno en un rango de condiciones controladas de voltaje, caudal y distancia al colector. Sin embargo, el efecto de dichos parámetros operacionales en el rango de electrohilabilidad estudiado no ha tenido una influencia significativa en el diámetro de las nanofibras. Es decir, puede concluirse que el voltaje, caudal y distancia al colector afectan fundamentalmente a la viabilidad de la electrohilatura (el sistema hila o no hila) pero sin que estos parámetros afecten significativamente el diámetro de las nanofibras dentro del intervalo experimental estudiado. Por el contrario, el tipo de polímero (gelatina o colágeno), la concentración de polímero, el tipo de disolvente y la conductividad del colector sí que han demostrado tener una influencia significativa en el diámetro final de las nanofibras. En este sentido, se ha observado que el

diámetro de las nanofibras disminuye cuando se utiliza gelatina como polímero, bajas concentraciones de gelatina, ácido acético como disolvente y colectores de mayor conductividad eléctrica.

5. Agradecimientos

Los autores agradecen el apoyo técnico recibido de F. Cano y J. A Tornero en el desarrollo del sistema de electrohilatura, así como la ayuda de A. Duran en la realización de los experimentos de laboratorio.

6. Bibliografía

1. Bhardwaj, N.; Kundu, S.C. Electrospinning: a fascinating fiber fabrication technique. *Biotechnol. Adv.* 2010, 28, 325–47.
2. Formhals, A. Process and apparatus for preparing artificial threads. US Patent No. 1,975,504, 1934.
3. Greiner, A.; Wendorff, J.H. Electrospinning: a fascinating method for the preparation of ultrathin fibers. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2007, 46, 5670–5703.
4. Nain, A.S; Wong, J. C; Amon C.H.; Sitti M. Drawing suspended polymer micro-/nanofibers using glass micropipettes. *Appl. Phys. Lett.* 2006, 89, 183105-183107.
5. Tao, S.L.; Desai T.A.; Aligned Arrays of Biodegradable Poly(ϵ -caprolactone) Nanowires and Nanofibers by Template Synthesis. *Nano Lett.* 2007, 7, 1463–1468.
6. Zhao, J.; Han W.; Chen H.; Tu, M.; Zeng, R.; Shi Y. Preparation, structure and crystallinity of chitosan nano-fibers by a solid–liquid phase separation technique. *Carbohydr. Polym.* 2011, 83, 1541–1546.

7. Rolandi, M.; Rolandi, R. Self-assembled chitin nanofibers and applications. *Adv. Colloid Interface Sci.* 2014, 207, 216–222.
8. Taylor, G. Disintegration of Water Drops in an Electric Field. *Proc. R. Soc. A. Math. Phys. Eng. Sci.* 1964, 280, 383–397.
9. Di, J.; Zhao Y.; Yu J. Fabrication of molecular sieve fibers by electrospinning. *J. Mater. Chem.* 2011, 21, 8511–8520.
10. Sukigara, S.; Gandhi, M.; Ayutsede, J.; Micklus, M.; Ko, F. Regeneration of Bombyx mori silk by electrospinning—part 1: processing parameters and geometric properties. *Polymer* 2003, 44, 5721–5727.
11. Jiang, H.; Fang, D.; Hsiao, B.S.; Chu, B.; Chen, W. Optimization and characterization of dextran membranes prepared by electrospinning. *Biomacromolecules* 2004, 5, 326–333.
12. Kim, H.S.; Kim, K.; Jin, H.J.; Chin, I.J. Morphological Characterization of Electrospun Nano-Fibrous Membranes of Biodegradable Poly(L-lactide) and Poly(lactide-co-glycolide). *Macromol. Symp.* 2005, 224, 145–154.
13. Zhang, H. Effects of electrospinning parameters on morphology and diameter of electrospun PLGA/MWNTs fibers and cytocompatibility in vitro. *J. Bioact. Compat. Polym.* 2011, 26, 590–606.
14. Huang, L.; Nagapudi, K.; Apkarian, R.P.; Chaikof, E.L. Engineered collagen–PEO nanofibers and fabrics. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 2001, 12, 979–993.
15. Deitzel, J.; Kleinmeyer, J.; Harris, D.; Beck, T. N. The effect of processing variables on the morphology of electrospun nanofibers and textiles. *Polymer* 2001, 42, 261–272.
16. Son, W.K.; Youk, J.H.; Lee T.S.; Park W.H. The effects of solution properties and polyelectrolyte on electrospinning of ultrafine poly(ethylene oxide) fibers. *Polymer* 2004, 45, 2959–2966.

17. Zhang, C.; Yuan, X.; Wu, L.; Han, Y.; Sheng, J. Study on morphology of electrospun poly(vinyl alcohol) mats. *Eur. Polym. J.* 2005, 41, 423–432.
18. Cengiz, F.; Dao, T.A.; Jirsak, O. Influence of solution properties on the roller electrospinning of poly(vinyl alcohol). *Polym. Eng. Sci.* 2010, 50, 936–943.
19. Rwei, S.P.; Huang, C.C. Electrospinning PVA solution-rheology and morphology analyses. *Fibers Polym.* 2012, 13, 44–50.
20. Jeun, J.; Kim, Y.; Lim, Y.; Choi, J.; Jung, C.; Kang, P. Electrospinning of Poly (L-lactide- co -D , L-lactide). *J. Ind. Eng. Chem.* 2007, 13, 592–596.
21. Nayak, R.; Padhye, R.; Kyratzis, I.L.; Truong, Y.B.; Arnold L. Effect of viscosity and electrical conductivity on the morphology and fiber diameter in melt electrospinning of polypropylene. *Text. Res. J.* 2012, 83, 606–617.
22. Beachley, V.; Wen, X. Effect of electrospinning parameters on the nanofiber diameter and length. *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* 2009, 29, 663–668.
23. He, J.; Wan, Y.Q.; Yu, J.Y. Effect of Concentration on Electrospun Polyacrylonitrile (PAN) Nanofibers. *Fibers Polym.* 2008, 9, 140–142.
24. Lin, J.; Qin, X. Effect of solution concentration on jet stretching of electrospinning PVA nanofiber. *Int. J. Fluid Mech. Res.* 2011, 38, 479–488.
25. Chowdhury, M.; Stylios, G. Effect of Experimental Parameters on the Morphology of Electrospun Nylon 6 fibres. *Int. J. Basic Appl. Sci.* 2010, 10, 70–78.
26. Supaphol, P.; Mit-Uppatham, C.; Nithitanakul, M. Ultrafine electrospun polyamide-6 fibers: Effect of emitting electrode polarity on morphology and average fiber diameter. *J. Polym. Sci. Part B Polym. Phys.* 2005, 43, 3699–3712.
27. Hekmati, A. H.; Rashidi, A.; Ghazisaeidi, R.; Drean, J.Y. Effect of needle length, electrospinning distance, and solution concentration on morphological properties of polyamide-6 electrospun nanowebs. *Text. Res. J.* 2013, 83, 1452–1466.

28. Koski, A.; Yim, K.; Shivkumar, S. Effect of molecular weight on fibrous PVA produced by electrospinning. *Mater. Lett.* 2004, 58, 493–497.
29. Casper, C.L.; Stephens, J.S.; Tassi, N.G.; Chase D.B.; Rabolt, J.F. Controlling surface morphology of electrospun polystyrene fibers: Effect of humidity and molecular weight in the electrospinning process. *Macromolecules* 2004, 37, 573–578.
30. Ojha, S.S.; Afshari, M.; Kotek, R.; Gorga, R.E. Morphology of electrospun nylon-6 nanofibers as a function of molecular weight and processing parameters. *J. Appl. Polym. Sci.* 2008, 108, 308–319.
31. Pant, H.R.; Nam, K.T.; Oh, H.J.; Panthi, G.; Kim, H.D.; Kim, B. Effect of polymer molecular weight on the fiber morphology of electrospun mats. *J. Colloid Interface Sci.* 2011, 364, 107–111.
32. Angammana, C.J.; Member, S.; Jayaram, S.H. Analysis of the Effects of Solution Conductivity on Electrospinning Process and Fiber Morphology. *IEEE Trans. Ind. Appl.* 2011, 47, 1109–1117.
33. Remant, K.C.; Kim, K.W.; Bhattarai, S.R.; Kim, H.Y.; Lee, D.R. Effect of collector temperature and conductivity on the chain conformation of nylon 6 electrospun nanofibers. *Fibers Polym.* 2007, 8, 186–191.
34. Yang, Y.; Jia, Z.; Liu, J.; Li, Q.; Hou, L.; Wang, L.; Guan, Z. Effect of electric field distribution uniformity on electrospinning. *J. Appl. Phys.* 2008, 103, 104307.
35. Sohrabi, A.; Shaibani, P.M.; Thundat, T. The effect of applied electric field on the diameter and size distribution of electrospun Nylon 6 nanofibers. *Scanning* 2013, 35, 183–188.
36. Jalili, R.; Hosseini, S.A.; Morshed, M. The Effects of Operating Parameters on the morphology of electrospun polyacrilonitrile nanofibres. *Iran Polym. J.* 2005, 14, 1074–1081.

37. Zargham, S.; Bazgir, S.; Tavakoli, A.; Rashidi, A.S.; Damerchely, R. The Effect of Flow Rate on Morphology and Deposition Area of Electrospun Nylon 6 Nanofiber. *J. Eng. Fiber Fabr.* 2012, 7, 42–49.
38. Wen, X.T.; Fan, H.S.; Tan, Y.F.; Cao, H.D.; Li, H.; Cai, B. Preparation of electrospun PLA nanofiber scaffold and the evaluation in vitro. *Key Eng. Mater.* 2005, 288-289, 139–142.
39. Cipitria, A.; Skelton, A.; Dargaville, T.R.; Dalton, P.D.; Hutmacher, D.W. Design, fabrication and characterization of PCL electrospun scaffolds-a review. *J. Mater. Chem.* 2011, 21, 9419–9453.
40. Wang, H.; Qin, X.; Cao, J.; Study on Structures of electrospinning cellulose acetate nanofibers. *Adv. Mat. Res.* 2011, 175-176, 242–246.
41. Homayoni, H.; Ravandi, S.A.H.; Valizadeh, M. Electrospinning of chitosan nanofibers: Processing optimization, *Carbohydr. Polym.* 2009, 77, 656–661.
42. Matthews, J.A.; Wnek, G.E.; Simpson, D.G.; Bowlin G.L. Electrospinning of collagen nanofibers. *Biomacromolecules* 2002, 3, 232–238.
43. Sell, S.A.; McClure, M.J.; Garg, K.; Wolfe, P.S.; Bowlin, G.L. Electrospinning of collagen/biopolymers for regenerative medicine and cardiovascular tissue engineering. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2009, 61, 1007–1019.
44. Huang, Z.M.; Zhang, Y.; Ramakrishna, S.; Lim, C. Electrospinning and mechanical characterization of gelatin nanofibers. *Polymer* 2004, 45, 5361–5368.
45. Panzavolta, S.; Gioffrè, M.; Focarete, M.L.; Gualandi, C.; Foroni, L.; Bigi, A. Electrospun gelatin nanofibers: optimization of genipin cross-linking to preserve fiber morphology after exposure to water. *Acta Biomater.* 2011, 7, 1702–1709.
46. Fang, X.; Reneker, D.H. DNA fibers by electrospinning. *J. Macromol. Sci. Part B* 1997, 36, 169–173.

47. Brenner, E.K., Schiffman, J.D., Thompson, E.A., Toth, L.J., Schauer, C.L.
Electrospinning of hyaluronic acid nanofibers from aqueous ammonium solutions.
Carbohydr. Polym. 2012, 87, 926–929.
48. Ritcharoen, W.; Thaiying, Y.; Saejeng, Y.; Jangchud, I.; Rangkupan, R.; Meechaisue, C.
Electrospun dextran fibrous membranes. Cellulose 2008, 15, 435–444.
49. Li, M.; Mondrinos, M.J.; Gandhi, M.R.; Ko, F.K.; Weiss, A.S.; Lelkes, P.I. Electrospun protein fibers as matrices for tissue engineering. Biomaterials 2005, 26, 5999–6008.
50. Kim, H.W.; Song, J.H.; Kim, H.E. Nanofiber Generation of Gelatin-Hydroxyapatite Biomimetics for Guided Tissue Regeneration. Adv. Funct. Mater. 2005, 15, 1988–1994.
51. Zhang, Y.; Ouyang, H.; Lim, C.T.; Ramakrishna, S.; Huang Z.M. Electrospinning of gelatin fibers and gelatin/PCL composite fibrous scaffolds. J. Biomed. Mater. Res. B. Appl. Biomater. 2005, 72, 156–165.
52. Zhang, Y.Z.; Venugopal, J.; Huang, Z.M.; Lim, C.T.; Ramakrishna, S. Crosslinking of the electrospun gelatin nanofibers. Polymer 2006, 47, 2911–2917.
53. Su, B.; Venugopal, J.; Ramakrishna, S. Biomimetic and bioactive nanofibrous scaffolds from electrospun composite nanofibers. Int. J. Nanomedicine. 2007, 2(4), 623–638.
54. Kew, S.J.; Gwynne, J.H.; Enea, D.; Abu-Rub, M.; Pandit, A.; Zeugolis, D. Regeneration and repair of tendon and ligament tissue using collagen fibre biomaterials. Acta Biomater. 2011, 7, 3237–3247.
55. Jha, B.S.; Ayres, C.E.; Bowman, J.R.; Telemeco, T. A.; Sell, S. A.; Bowlin, G.L. Electrospun Collagen: A Tissue Engineering Scaffold with Unique Functional Properties in a Wide Variety of Applications. J. Nanomater. 2011, 1–15.
56. He, W.; Yong, T.; Teo, W.E.; Ma, Z.; Ramakrishna, S. Fabrication and endothelialization of collagen-blended biodegradable polymer nanofibers: potential vascular graft for blood vessel tissue engineering. Tissue Eng. 2005, 11, 1574–1588.

57. Ki, C.S.; Baek, D.H.; Gang, K.D.; Lee, K.H.; Um, I.C.; Park, Y.H. Characterization of gelatin nanofiber prepared from gelatin–formic acid solution. *Polymer* 2005, 46, 5094–5102.
58. Song, J.H.; Kim, H.E.; Kim, H.W. Production of electrospun gelatin nanofiber by water-based co-solvent approach. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 2008, 19, 95–102.
59. Chen, H.C.; Jao, W.C.; Yang, M.C. Characterization of gelatin nanofibers electrospun using ethanol/formic acid/water as a solvent. *Polym. Adv. Technol.* 2009, 20, 98–103.
60. Songchotikunpan, P.; Tattiyakul, J.; Supaphol, P. Extraction and electrospinning of gelatin from fish skin. *Int. J. Biol. Macromol.* 2008, 42, 247–255.
61. Gu, S.Y.; Wang, Z.M.; Ren, J.; Zhang, C.Y. Electrospinning of gelatin and gelatin/poly(l-lactide) blend and its characteristics for wound dressing. *Mater. Sci. Eng. C* 2009, 29, 1822–1828.
62. Linh, N.T.B.; Lee, B.T. Electrospinning of polyvinyl alcohol/gelatin nanofiber composites and cross-linking for bone tissue engineering application. *J. Biomater. Appl.* 2012, 27, 255–66.
63. Panzavolta, S.; Gioffrè, M.; Focarete, M.L.; Gualandi, C.; Foroni, L.; Bigi, A. Electrospun gelatin nanofibers: optimization of genipin cross-linking to preserve fiber morphology after exposure to water. *Acta Biomater.* 2011, 7, 1702–1709.
64. Zha, Z.; Teng, W.; Markle, V.; Dai, Z.; Wu, X. Fabrication of gelatin nanofibrous scaffolds using ethanol/phosphate buffer saline as a benign solvent. *Biopolymers* 2012, 97, 1026–1036.
65. Subbiah, T.; Bhat, G.S.; Tock, R.W.; Parameswaran, S.; Ramkumar, S.S. Electrospinning of nanofibers, *J. Appl. Polym. Sci.* 2005, 96, 557–569.
66. Geng, X.; Kwon, O.H.; Jang, J. Electrospinning of chitosan dissolved in concentrated acetic acid solution. *Biomaterials.* 2005, 26, 5427–5432.

67. Agreda, V.H. (Editor). *Acetic Acid and its Derivatives*. 1992, CRC Press, 1st edition.
68. Yang, L.; Fitié, C.F.C.; Van der Werf, K.O.; Bennink, M.L.; Dijkstra, P.J.; Feijen, J. Mechanical properties of single electrospun collagen type I fibers. *Biomaterials*. 2008, 29, 955–962.
69. Li, Z.; Wang, C. Effects of Working Parameters on Electrospinning, in: *One-Dimensional Nanostructures*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2013, 15–29.
70. Kim, S.E.; Heo, D.N.; Lee, J.B.; Kim, J.R.; Park, S.H.; Jeon, S.H. Electrospun gelatin/polyurethane blended nanofibers for wound healing. *Biomed. Mater.* 2009, 4, 044106.
71. Neves, N.M. Patterning of polymer nano fiber meshes by electrospinning for biomedical applications. *Int. J. Nanomedicine*. 2007, 2, 433–448.
72. Kumar, P. Effect of collector on electrospinning to fabricate aligned nanofiber, PhD Thesis, 2012.